Aus dem Klinisch-Chemischen Labor
(Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine)
der Universitäts-Nervenklinik Marburg/Lahn
(Komm. Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

BETRACHTUNGEN ZUR STRUKTUR UND BIOSYNTHESE DES HÄMOGLOBINS

Untersuchung zur Mössbauer-Spektrometrie des Hämoglobin-Eisens

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ANDRES PRINGSHEIM
aus Buenos Aires

1979

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Klinisch-Chemischen Labor
(Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine)
der Universitäts-Nervenklinik Marburg/Lahn
(Komm. Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

BETRACHTUNGEN ZUR STRUKTUR UND BIOSYNTHESE DES HÄMOGLOBINS

Untersuchung zur Mössbauer-Spektrometrie des Hämoglobin-Eisens

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ANDRES PRINGSHEIM
aus Buenos Aires

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg/Lahn am 26. 1. 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Dekan : Prof. Dr. F. Neurath

Referent : Prof. Dr. T.O. Kleine

Correferent : Prof. Dr. R. Thauer

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Struktur und Stoffwechsel des Hämoglobin-(Hb-) Moleküls	4
3.	Stereochemie des Hämoglobin-Moleküls	12
4.	Funktions des Hämoglobins	19
5.	Der normale Eisenstoffwechsel	22
6.	Aufbau der Atome und Begriff der Isotopie	27
7.	Zur Theorie der Mössbauer-Spektroskopie	28
8.	Material und Methode	35
9.	Ergebnisse	36
10.	Schlußfolgerung	36
11.	Zusammenfassung	36
12.	Danksagung	42
13.	Inhaltsverzeichnis	43

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546011_0040

1. EINLEITUNG

Unter den Eiweißkörpern, denen eine außerordentliche Bedeutung wegen ihrer funktionellen Beziehungen zukommt, steht das Hämoglobin-(Hb-)Molekül an vorrangiger Stelle. Ohne dieses wäre das Leben der Wirbeltiere, die von einer stabilen, gleichmäßigen und kontinuierlichen Sauerstoffzufuhr abhängig sind, nicht denkbar.

Die Kompliziertheit der Hb-Struktur, die in den letzten vierzig Jahren schrittweise aufgeklärt werden konnte, bot die Möglichkeit, die funktionellen Beziehungen ihrer Bausteine während der Oxy- und Deoxygenierung zu beobachten. Kein Protein bietet eine solche Variabilität an Mutationen mit s unterschiedlichen Auswirkungen auf die Stabilität und Funktion des für den Sauerstofftransport ausgerichteten Hämoproteins. Störungen in der Synthese und Abweichungen in der Eiweißstruktur sind seit mehr als zwei Jahrzehnten bekannt. Ein struktureller Defekt in der Anordnung der Aminosäuren führt entweder zu einer Störung der Funktion und/oder Beeinträchtigung der Stabilität des Hämoglobinmoleküls (s.4).

Durch den Häm-Eisen-Komplex, an dem die reversible Sauerstoffbindung erfolgt, die in der Sigmoidform der O_2-Bindungskurve den funktionellen Bedürfnissen entspricht, ereignen sich an den vier Eisenatomen (sog. Häm-Häm) auch homotrope Wechselwirkungen, die die Geschwindigkeit der O_2-Aufnahme mit zunehmender Oxygenierung beschleunigt. Der gleiche begünstigende Effekt wird auch bei der O_2-Abgabe wirksam, unterstützt durch den Bohr-Effekt (1) (Abhängigkeit der O_2-Affinität vom pH) und Polyphosphate (2,3 - Diglycerophosphat) (2). Die Gesamtheit der unterstützenden Effekte bezeichnet man als heterotrope Wechselwirkungen.

Die von PERUTZ durchgeführten Röntgenstruktur-Analysen des Hb-Moleküls erlaubten eine Klärung der Kooperativitäts-

mechanismen auf molekularer bzw. atomarer Ebene. Dabei zeigte sich, daß mit der O_2-Aufnahme und -Abgabe Konformationsänderungen des Globinanteils durch intramolekulare Bewegungen einhergehen, die letztlich durch Veränderung der Kontakte zwischen gleichen und ungleichen Polypeptidketten beim Übergang des Hb-Moleküls in die oxy- oder deoxy-Form bewirkt werden (s.4).

Ausgelöst werden die gesamten Bewegungsabläufe durch das Eisenatom. Sobald die 6. Koordinationsstelle bei der Sauerstoffaufnahme besetzt ist, wird der Radius des Eisenatoms kleiner und führt eine Bewegung in Richtung auf die Hämebene aus. Der Übergang von einer Hämoglobinstruktur in die andere (oxy $\rightleftharpoons$ deoxy) ist somit mit Bewegungen und räumlichen Verschiebungen innerhalb des Moleküls verbunden.

Bekannt ist die Tatsache, daß die in der Natur vorkommenden Elemente in den meisten Fällen eine Mischung mehrerer Isotope darstellen, die sich untereinander durch ihren prozentualen Anteil in der Natur, physikalischen Eigenschaften und auch chemischen Wirkungen unterscheiden. Die Wirksamkeit verschiedener natürlicher Isotope eines Elements auf den Ablauf von enzymatischen Reaktionen ist seit längerer Zeit für einige Elemente bekannt, wie z.B. Deuterium (3,4,5), Tritium (6), Schwefel (7), Kohlenstoff (8). Der hier leitende Gedanke, für den ich eine Antwort suchte, war die Frage, ob das Eisen (Fe) im Hämoglobin der roten Blutkörper sich isotopisch im selben Anteilverhältnis befindet wie die in der Natur zu findende stabile Fe-Isotope: ^{54}Fe = 5,82%, ^{56}Fe = 91,6%, ^{57}Fe = 2,17%, ^{58}Fe = o,31% (9). Damit verbindet sich die Frage, ob ein anderes Verteilungsverhältnis dieser Fe-Isotope im Hb andere biologische Eigenschaften hervorruft.
Bei der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, eine der vier stabilen Fe-Isotope, nämlich ^{57}Fe, im Hämoglobin mehrerer Blutproben von Patienten mittels Mössbauer-

Spektroskopie zu bestimmen, um festzustellen, ob ein Unterschied im prozentualen Anteil zwischen ^{57}Fe in der Natur und demjenigen, der im Hb-Molekül einverleibt ist, besteht. Leider war es technisch nicht möglich, eine m.E. optimalere Untersuchung mit Massenspektrometrie durchzuführen.

2. STRUKTUR UND STOFFWECHSEL DES HÄMOGLOBIN-(Hb-)MOLEKÜLS

Im Blutstrom befinden sich durchschnittlich 5 x $1o^6$ Erythrozyten pro Microliter. Jeder dieser roten Blutkörperchen enthält etwa 28o x $1o^6$ Moleküle Hämoglobin (Hb), das wegen seiner Eigenschaft, farbig zu sein, der Gruppe der Chromoproteine zugeordnet wird. Hämoglobin ist ein Eisen-Porphyrinprotein, das sich aus vier Hämmolekülen und vier Polypeptidketten zusammensetzt, die je ein Globinmolekül bilden. Das Säugetier-Hb hat ein Molekulargewicht von etwa 68 ooo, wobei der geringere Anteil der prosthetischen Gruppe, also dem Häm, entfällt.

Der Kern des Hämoglobinmoleküls ist die Häm-Gruppe: 1 Eisen-Atom umgeben von einem Porphyrinring; dieser wird gebildet aus 4 Untereinheiten - Pyrrole genannt -, die durch ungesättigte Kohlenstoff-Brücken (sog. Methenbrücken) verbunden werden. Häm wird gebildet durch Ersetzen von 2 Protonen aus zwei Pyrrolen durch ein divalentes Ion, z.B. CO^{2+}, Mg^{++}, Mn^{++}, Ni^{++}, Zn^{++}, in unserem Fall Eisen (Fe^{++}) (1o). Metalle können enzymatisch (Fe, Cu, Co) oder chemisch (Ni, Sn) in den Porphyrring eingelagert werden. In Abhängigkeit von der räumlichen Lage der verschiedenen Seitenketten in Position 1 bis 8 des Pyrrols ist die Entstehung verschiedener Isomere möglich.

Protoporphyrin IX ist der unmittelbare Vorläufer des Häms (s. Abb.1a und 1b). Der biosynthesische Weg des Häms ist eine Sequenz von enzymatischen Schritten, bei denen 8 Moleküle von pyridoxyl-aktivierten Glycin und CoA-aktivierten Succinat letztlich in ein Hämmolekül kondensiert werden.
Die Reaktion, wobei sich der α-Kohlenstoff des Glycins mit dem Carbonyl-Kohlenstoff des Succinats kombiniert, um delta-Aminolevulinsäure (ALS) zu bilden, wird durch das mitochondriale Enzym ALS-Synthetase katalysiert (11).
Eine der hauptsächlichsten und kürzlich definierten Wirkungen von Spurenelementen ist die Regulierung der Synthese dieses

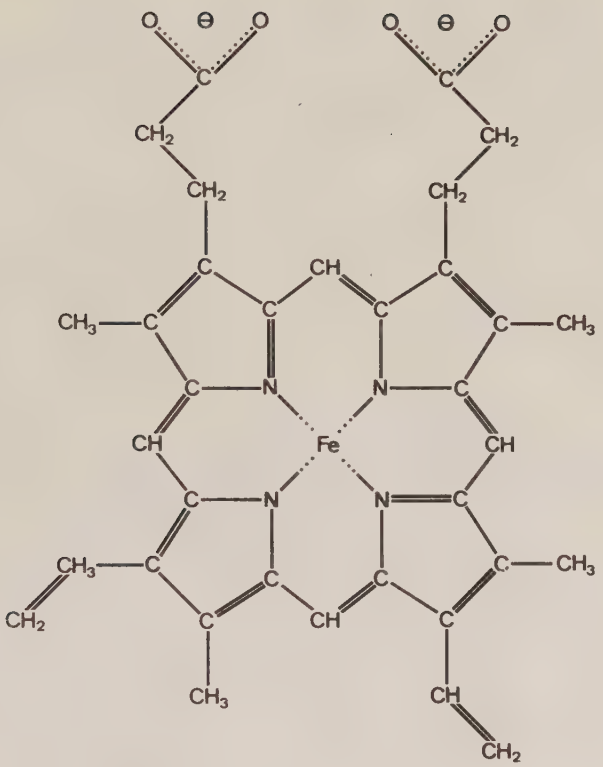


Abb. 1 a : Strukturformel des Hämoglobins (34)

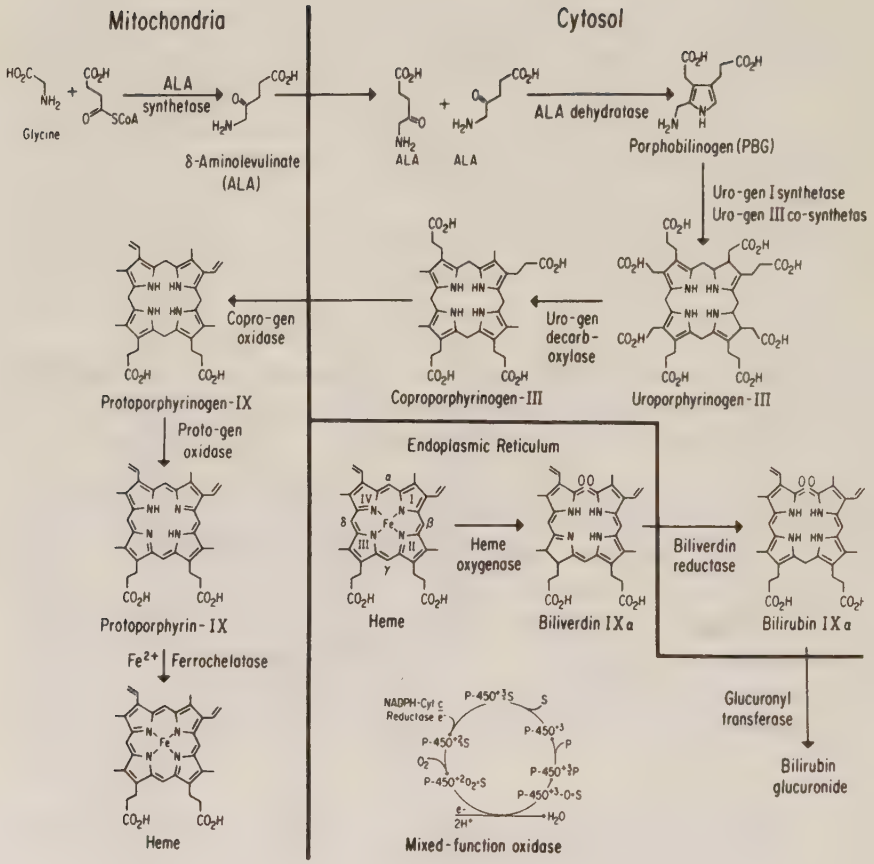


Abb. 1 b : Die Wege der Häm-Biosynthese und des Abbaus (10)

geschwindigkeitsbegrenzenden Enzyms, hauptsächlich durch Hemmung (12).

Untersuchungen ergaben, daß Metallione alleine die Produktion und den Abbau von Häm durch Regulierung der Synthese der geschwindigkeitsbegrenzenden Enzyme, die diese Prozesse in der Zelle katalysieren, steuern können (13). Durch eine Serie von enzymatischen Reaktionen, die im Zytoplasma der Zelle stattfinden, wird, ausgehend vom ALS, eine tetracarboxylische intermediäre Substanz gebildet (Koproporphyrinogen III). Dieses Porphyrin dringt in die Mitochondrien ein, wo es decarboxyliert und oxydiert wird, um das Protoporphyrin IX zu bilden. Häm wird nach Einverleibung von Fe in den Protoporphyrin-IX-Ring mittels des mitochondrialen Enzyms Ferrochelatase synthetisiert.

Beim Abbau des Hämmoleküls wird die Ringstruktur oxydativ gespalten zu einer offenen Tetrapyrrolkette: das Biliverdin, wobei das zentrale Metallion freigegeben wird. Das Enzym, das die Oxydation des Häm katalysiert, ist an den Mikrosomen des endoplasmatischen Retikulum gebunden und wird Hämoxygenase genannt (14). Das durch Oxydation an dem α-Methene-Kohlenstoff gebildete Biliverdin wird durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert.
Eine zweite, neuerdings festgestellte und sehr starke Wirkung der Spurenelemente auf den Häm-Stoffwechsel ist die Fähigkeit, durch de novo-Enzym-Induktion die Aktivität der mikrosomalen Hämoxygenase zu regulieren (15,16).
Erhebliche experimentelle Beweise unterstützen die Vorstellung, daß die Auf- und Abbaugeschwindigkeit des Häm in erster Linie eine Funktion der Konzentration des Fe-Metallions an passende Receptoren in der Zelle ist. Entsprechend diesem Gesichtspunkt ist der Fe-Anteil des Häm (Fe-Protoporphyrin IX) tatsächlich der unmittelbare Faktor, der den Häm-Stoffwechsel kontrolliert. Die Rolle von Metallen in der Funktion und Struktur von vielen Enzymen wurden schon früher gut dokumentiert (17).

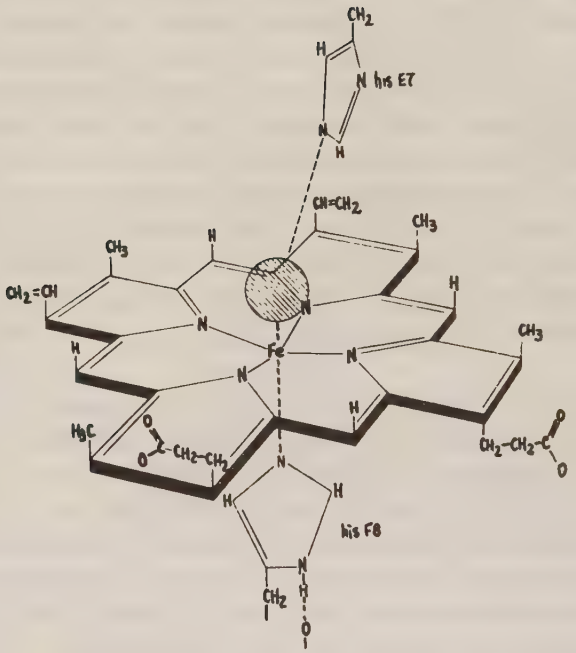


Abb. 2 a : Hämstruktur mit ihrem proximalen F8-Histidin. Die Sphäre stellt die Bindungsregion des 6.Liganden mit dem Eisen dar (47).

Abb. 2 b : Die vier Ketten des Oxyhämoglobins (34).

Bekannt ist auch die Tatsache, daß Metallionen mit Nukleinsäuren und Nukleotiden in Wechselwirkungen treten können; verschiedene Elemente, speziell die Erdalkalimetallionen, haben eine Wirkung auf strukturelle sowie funktionelle Merkmale von Chromosomen (18,19).

VALLEE und WACKER (2o) berichten in ihrer Arbeit, daß das Fe der RNS (Ribonukleinsäure) sehr fest gebunden ist und äußern den Gedanken, daß Metalle eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Gestalt der RNS-Moleküle spielen, und deuten darauf hin, daß Metalle eine wichtige funktionelle Beziehung zur Proteinsynthese und der Übertragung der genetischen Information haben könnten.

Wie oben erwähnt sind die physiologischen Häm-Systeme an gewisse Proteine gebunden, beim Hämoglobin handelt es sich um das Globin, ein Eiweißkörper, dessen Primärstruktur 1961 von BRAUNITZER und KÖNIGSBERG bestimmt wurde (21). Sie besteht aus 2 α- und 2 β-Polypeptidketten. Jede Alphakette enthält 141 und jede Betakette 146 Aminosäurereste in einer für die verschiedenen Arten spezifischen, genetisch determinierten Sequenz. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zeigt eine starke Ähnlichkeit der 4 Ketten, die noch mehr hervortritt, wenn man die α- und β-Ketten Seite an Seite legt und die α-Kette Reste über die β-Kette anreiht, so daß eine Lücke zwischen 2 Resten in der α-Kette entsteht. Daraus wird eine gewisse Übereinstimmung zwischen den 4 Ketten ersichtlich.

Hinsichtlich ihres Proteinanteils macht das menschliche Hb in der Ontogenese eine Entwicklung durch; schon in Embryos, 1o bis 12 Wochen alt, wurde ein Hb aus 2 α- und 2 ε-Ketten isoliert, genannt Gower-2, und ein Hb mit 4 ε-Ketten, Gower-1 (22, 23, 24). Etwa im 3. bis 4. Monat der Gestation verschwindet das embryonale Hb und stattdessen wird Hb F (fetal) gebildet, das aus 2 α- und 2 γ-Ketten besteht. Im weiteren Verlauf wird der Gehalt an Hb A (adult), das schon in geringem Anteil in Feten zu finden ist, größer. Bei der Geburt sind

etwa 5-1o% des gesamten Hb vom HbF-Typ, und im Alter von ungefähr 3 Jahren sind die beim normalen Erwachsenen gefundenen Werte erreicht (weniger als 2%) (25). Im Hb des Erwachsenen sind wahrscheinlich die zwei wichtigsten Aminosäurereste in jeder der 4 Ketten die Hystidine (α-58, α-87, β-63 und β-92), weil sie sozusagen das Häm zwischen diesen Aminosäureresten aufhängen.

Der genetische Mechanismus, der die Struktur der Globinpolypeptidketten in ihrer Aminosäuresequenz bestimmt, ist nicht eindeutig geklärt. Mehr als 1oo Hb-Varianten sind bekannt, einige sind klinisch von Bedeutung, z.B. das Sichelzell Hb-S, in dem die Glutaminsäure in der Position 6 der β-Kette durch Valin ausgetauscht ist, und im Hb-C, wo das Lysin in derselben Kette und Position durch Valin ersetzt wird.

Die Polypeptidketten bei dem Aufbau von Proteinen unterliegen einer nativen, relativ instabilen Konformation, die durch die Wechselwirkung der Haupt- und Nebenvalenzen der Aminosäuren entstehen. Nebenvalenzbildungen entstehen zwischen den funktionellen Gruppen; drei Formen sind bekannt: Wasserstoffbrückenbindung, Ionenbindung und hydrophobe Wechselwirkung.

Mittels der Kristallstrukturanalyse durch Röntgenstrahlen konnte die Anordnung der Amidgruppen der Aminosäuren festgestellt werden. Dabei stellte sich heraus, daß die Polypeptidstrukturen nicht nur in einer Ebene sich anordnen können (auch β-Faltblatt-Strukturen), sondern auch schraubenförmig sog. Helix-Strukturen bilden, wobei die Wasserstoffbindung von einer Peptidbindung entweder zur dritt- (α-Helix), viert- (π-Helix) oder fünftnächsten (γ-Helix)-Peptidbindung gebildet wird. Diese Strukturen faßt man unter dem Begriff der Sekundärstruktur zusammen (26).
Am bekanntesten sind die α-Helix-Strukturen. In ihr ist jede Peptidbindung in beiden Richtungen entlang der Polypeptidkette mit dem drittnächsten Aminosäurerest verbunden. Die Ganghöhe der Schraube wurde zu 5,38 Å bestimmt; pro Schraubenwindung

finden sich 3,6 Aminosäurereste, und der Durchmesser der Schraube liegt bei 1o,5 Å. Solch eine Struktur findet sich bei vielen globulären Proteinen, wie z.B. beim Hb.

Es gibt noch weitere Nebenvalenzbindungen, die für eine Stabilisierung von Bedeutung sind; sie bilden sich zwischen den polaren oder apolaren sauren, basischen oder neutralen Seitenketten der Aminosäurereste aus und bewirken, daß das Protein eine kompakte räumliche Anordnung erhält. Durch Faltung der Polypeptidkette werden sie in Nachbarschaft zueinander gebracht. Diese Bindungen, die die natürliche Konformation stabilisieren, bewirken die Tertiärstruktur eines Proteins.

Die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Aminosäurereste beschränken sich nicht auf diejenigen innerhalb einer Polypeptidkette, sondern können ebenso verschiedene Bindungen mit anderen Polypeptidketten herstellen, so daß mehrere Polypeptidketten durch Nebenvalenzstabilisierung zu einer funktionellen Einheit verbunden werden können. Den Aufbau eines Eiweißmoleküls aus einer definierten Anzahl von Polypeptidketten, die nicht durch Peptidbindungen zusammengehalten werden, bezeichnet man als Quartärstruktur.

3. STEREOCHEMIE DES HÄMOGLOBIN-MOLEKÜLS

Die Gestalt des Hb-Moleküls zeigte anhand kristallographischer Untersuchungen eine annähernd kugelige Struktur für HbO mit einer Länge von 65 Å, einer Breite von 55 Å und einer Höhe von 5o Å (s.Abb.3). PERUTZ und mehrere andere Autoren konnten mit Hilfe der Röntgenstrahlbeugungstechnik das Diffraktionsmuster des Hämoglobins bei verschiedenen Tierarten und beim Menschen im unligierten (desoxy) und ligierten (oxy) Zustand bei verschiedenen Auflösungsvermögen der Elektronendichte ermitteln (27, 28, 29).

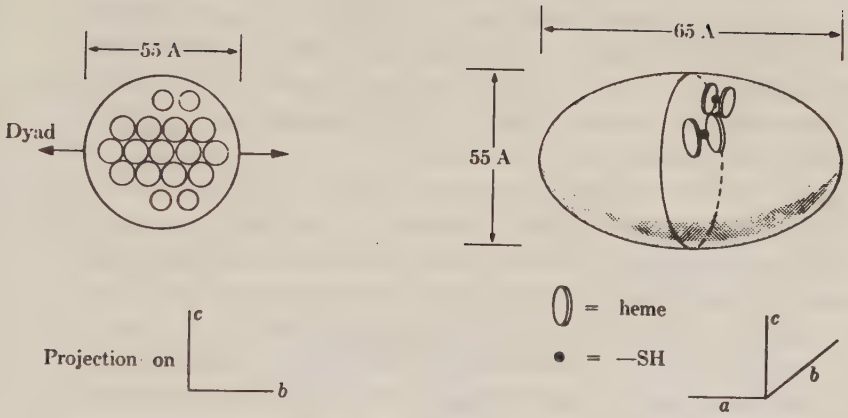
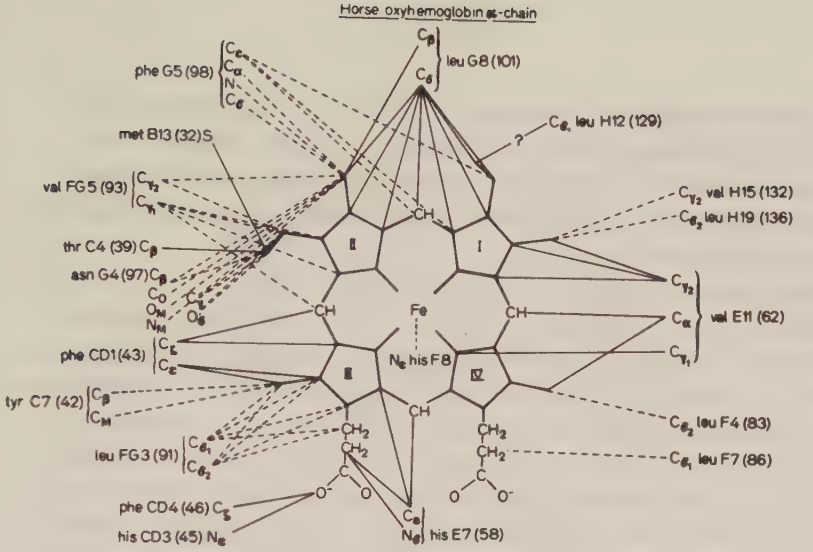


Abb. 3 : Schematische Darstellung des Hämoglobin-Moleküls. Die Position der Hämgruppen ist eine von vielen möglichen, ihre Orientierung ist dieselbe wie sie im Hb-Molekül vorliegt (Aus Acta Cryst.5, 135 (1952).

Bei allen Untersuchungen zeigte sich, daß die 4 Polypeptidketten tetrahedisch angeordnet sind und daß jede ein Häm-Molekül trägt, das in einer Tasche nicht polarer Gruppen nahe der Proteinoberfläche sich befindet. Die Kontakte zwischen den α- und β-Ketten und ihrer Häm-Moleküle, wie an den Kristallen gemessen wurde, sind schematisch in Abb.4 dargestellt (3o). Außer der kovalenten Bindung zwischen Fe und Histidin F8 (s. Abb.2a) wurden ungefähr 6o Wechselwirkungen ausgemacht zwischen Atomen der Globinketten, die mit einer Entfernung von 4 Å zu den Atomen des Häms liegen, alle Bindungen mit Ausnahme von einer in der α-Kette und den zwei in der β-Kette sind polar (3o).
In der α-Kette erstreckt sich der polare Kontakt von einer der zwei Propionsäurekarboxylgruppen bis zum Histidin CD3 (45) (s. Abb.4a), in der β-Kette kommt eine Propionsäurekarboxylgruppe in einer Kette in Berührung mit Serin CD3 (44) und in der anderen β-Kette wahrscheinlich mit Lysin E (1o) (66) (s. Abb.4). Alle polaren Kontakte existieren in Wasser, so daß angenommen wird, daß der Energiebindungsbeitrag gering ist. Die Unveränderlichkeit der Reste, die die Hämgruppe umgeben, deutet darauf, daß sie wesentlich für die Funktion des Hb-Moleküls sind. Wie NAKAHARA und WANG (31) voraussagten und später von KENDREW (32) im Myoglobin demonstriert wurde, liegt die Fähigkeit des Fe^{++} im Myoglobin und Hb, sich reversibel mit Sauerstoffmolekülen zu kombinieren, in der nicht polaren Umgebung.
Die Packung der Polypeptidketten im Hb ist derart, daß ein enger, ineinandergreifender Kontakt der Seitengruppen zwischen ungleichen Ketten, aber praktisch keine Berührung zwischen den gleichen Ketten besteht. Es gibt zwei Arten von Kontakten: a) zwischen Ketten benachbarter Häme (α_1, β_2 oder α_2 β_1) und b) zwischen weit voneinander entfernten Hämen (α_1 β_1 oder α_2 β_2). Der größte Teil der Wechselwirkungen zwischen den Berührungspunkten ist hydrophobisch; nur einige wenige sind zwischen Wasserstoffbindung und geladenen Gruppen vorhanden. Der α_1 β_1-Kontakt ist ausgedehnter als der α_1 β_2 mit ca.



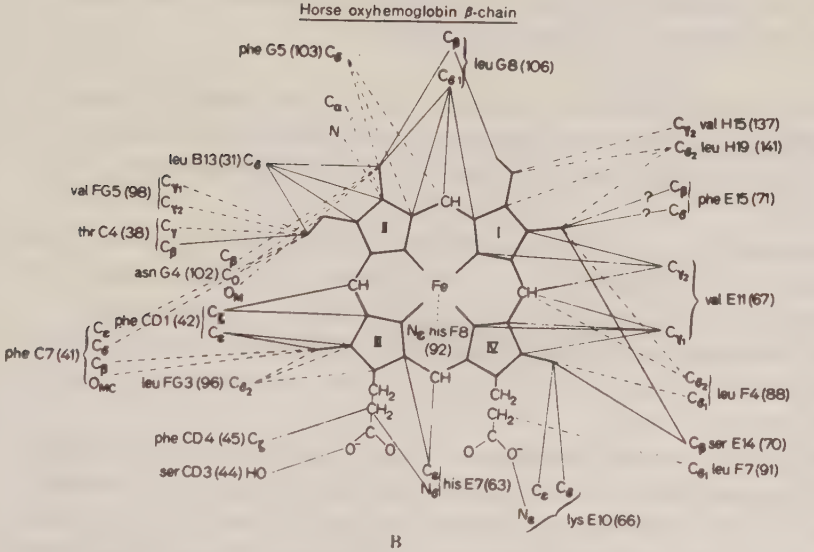


Abb. 4 a und 4 b : Kontakte zwischen Häm und Globin im Oxyhämoglobin. A = α-Ketten; B = β-Ketten. Alle Kontakte innerhalb 4 Å (3σ).

34 Seitenketten im Vergleich zu 19 im letztgenannten Typ. Wie schon erwähnt, kann Hb Kristalle bilden. Schon 1938 folgerte PERUTZ, daß ein α- und ein β-Kettenpaar mit dem anderen Paar (αβ) miteinander durch eine 2-zählige Symmetrieachse verbunden ist.
Vorerst noch einige kurze Erläuterungen über den kristallinen Zustand. Unter Kristall ist eine -im allgemeinen dreidimensionale- periodische Anordnung von Atomen, Ionen oder Molekülen zu verstehen. Periodisch heißt regelmäßige Wiederholung des elementaren dreidimensionalen Punktnetzes = Raumgitter. Für die analytische Beschreibung eines Raumgitters bedient man sich eines Koordinatensystems, dessen drei Achsen durch einen Gitterpunkt hindurchgehen. Diese drei Achsen bilden Achsensysteme; eines von diesen ist das rhombische A-System, das drei senkrecht aufeinanderstehende, ungleiche Achsen besitzt (33). Das Hämoglobin-Molekül gehört diesem Kristallsystem zugeordnet und hat eine sog. 222 Symmetrie mit drei sich gegenseitig senkrecht schneidenden Achsen, von denen zwei sich im Zentrum des Moleküls kreuzen.

Die Polypeptidketten werden als Pfeile, an denen Zylinder angeheftet sind, repräsentiert; die Symmetriebeziehungen sind jedoch die, die man tatsächlich bei dem Hb-Molekül antrifft.
Wenn man die ganze Einheit um 180^{o} um die Achse A dreht, dreht sich die α_1-Kette mit der α_2-Kette und β_1 mit β_2. Achse B bringt α_1 in Deckung mit β_2 und α_2 mit β_1. Da aber die α- und β-Untereinheiten im Detail unterschiedlich sind, bildet die Achse B eine Pseudo-Symmetrieachse; ähnliches gilt für die Achse C. (34)
Entlang der echten zweifachen Symmetrieachse für die ganzen 5o Å Durchmesser des Hb-Moleküls entsteht eine 2o Å breite Furche, die jedes Paar gleicher Ketten am obersten und untersten Teil des Moleküls um etwa 1o Å trennt. Diese Rinne ist von polaren Gruppen umsäumt und hat eine Tiefe von 25 Å (35).

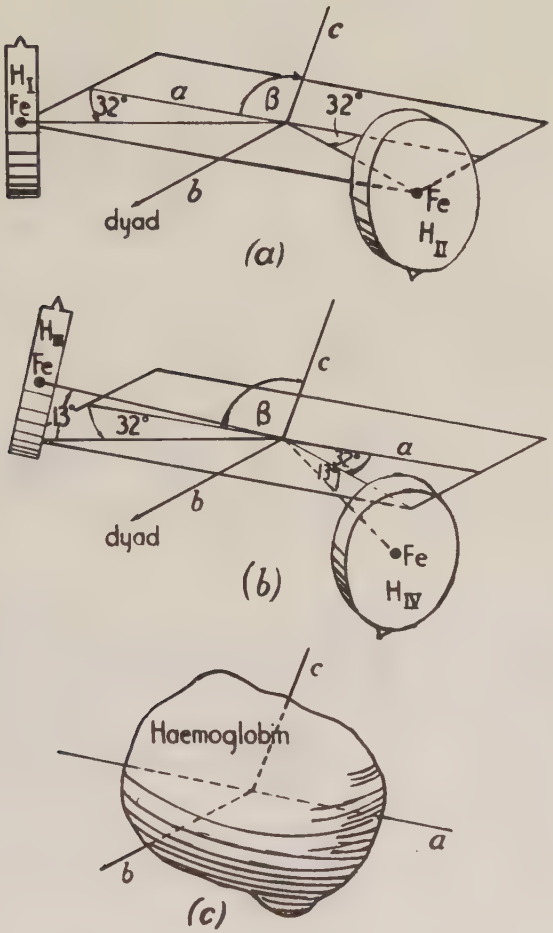


Abb. 5 : Perspektiv-Zeichnung der Orientierung der Hämgruppe in Bezug auf die Kristallachsen und das Häm-Molekül (37).

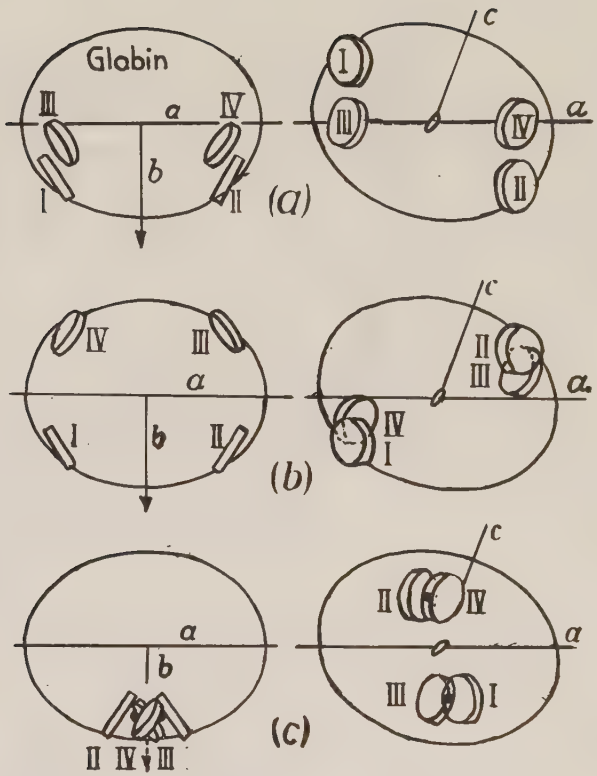


Abb. 6 : Drei der vielen möglichen Positionen der 4 Hämgruppen im Hämoglobin-Molekül, als Sphäroid dargestellt (37).

Die Konformationseigenschaften des Globinanteils hängen neben den Nebenvalenzbindungen von dem Häm-Molekül ab (36). BENNETT, GIBSON und INGRAM (37) untersuchten mittels ESR die Orientierung der Hämebenen im Hb-Molekül (s. Abb.5,6).

4. FUNKTION DES HÄMOGLOBINS

Sauerstofftransport.
Für einen ständigen Sauerstoffstrom, der unbedingt erforderlich ist für die energieliefernden Reaktionen, die sich in den Zellen abspielen, ist die Atmung von vorrangiger Wichtigkeit. Schematisch kann man sie in zwei Abschnitte einteilen:

a) Ventilation
b) Sauerstoffbindung an das Hämoglobin der roten Blutkörper.

In dieser Arbeit soll nur der Abschnitt b) berücksichtigt werden.

Bei der Bindung besetzt das O_2-Molekül anstelle des Histidinstickstoffatoms die sechste Koordinationsstelle des Eisens. Chemisch ist dieser Prozeß eine Sauerstoffbeladung (Oxigenierung) und nicht als Oxidation zu betrachten, da das Fe nach wie vor unverändert zweiwertig bleibt.
Die reversible Bindung des O_2 und sein Transport durch das Häm sind nur in Verbindung mit den Globinketten möglich. Jedes einzelne von den 4 Häm-Molekülen im Hb kann nur ein O_2-Molekül binden. Bei sehr niedrigen pO_2 (bis etwa 1o Torr) wird nur je Hb-Molekül ein Häm oxigeniert.
Die Dissoziations-Sättigungskurve des Hb hat einen S-förmigen Verlauf (Abb.7).

Die sigmoidförmige Dissoziations-Sättigungskurve des Hb besagt das Vorhandensein von Kooperativitätseffekten zwischen den vier Untereinheiten, so daß die Loslösung des O_2-Moleküls von einer Untereinheit die Wahrscheinlichkeit der Freilassung

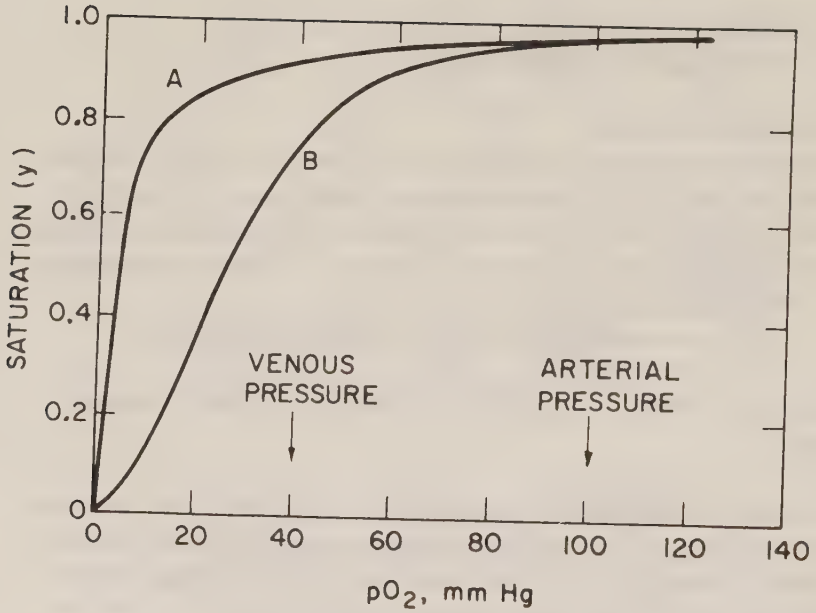


Abb. 7 : Sauerstoff Gleichgewichtskurven von A = Myoglobin und B = Hämoglobin (3o).

von O_2einer anderen Untereinheit desselben Hb-Moleküls erhöht. Ähnlich geschieht es mit der Bindung des O_2-Moleküls an die Häm-Gruppe. Infolge der Oxigenierung rücken die Häm-Moleküle der α-Ketten etwas auseinander, während die Häme der β-Ketten sich aufeinander zubewegen. Bei der O_2-Abgabe vollzieht sich der umgekehrte Vorgang. Wie schon weiter oben erwähnt, ist jedes Häm-Molekül in einer Tasche, die von den Polypeptidketten gebildet werden, eingebettet. Die vier Taschen liegen an der Oberfläche des Hb-Moleküls. Beim Vergleich der Häme zeigt sich, daß im Oxy-Hb das Fe-Atom in der Porphyrinebene liegt, der Spin S = 0 und der proximale (Häm-verbundene) Stickstoff N_{ε_2} vom Histidin F8 ungefähr 2,0 Å von der Porphyrinebene entfernt ist. Im deoxy-Hb wird das Fe-Atom ungefähr 0,75 Å von der Porphyrinebene in Richtung des proximalen Histidins F8 und Spin S = 2 verschoben.

Der Abstand zwischen N_{ε_2} vom Histidin F8 und der Porphyrinebene vergrößert sich auf 2,9 Å, und demzufolge entsteht eine geringe Verlängerung der Fe - N_{ε_2} -Verbindung von etwa 0,15 Å (HOARD 1968, 1971). α- und β-Ketten haben nicht identische, tertiäre Konformationen, sondern jede von ihnen kann in einer von zwei möglichen Konformationen bestehen. Diese Zustände bezeichnet man als "r" (relaxed) und "t" (tense). Beim oxy-Hb sind die Endgruppen jeder Polypeptidgruppe frei = relaxed, d.h. sie bilden keine Salzbrücken im Gegensatz zu der sog. "tense" = Form wie im deoxy-Hb. Die Sauerstoffaffinität ist sehr hoch in der "r"-Konformation und sehr gering in der "t"-Konformation.

Die Quartärstruktur des Hb ist die räumliche Anordnung der zwei α- und der zwei β-Ketten in Beziehung zueinander. Diese Konformation wird hauptsächlich durch nicht polare Zwischenwirkungen und eine geringe Anzahl elektrostatischer Bindungen (Salzbrücken) zusammengehalten.
Es gibt keine konvalente Bindung zwischen den Untereinheiten.

Mit Hilfe eines Koordinationssystems, dessen Nullpunkt im Massenzentrum der vier Häm-Gruppen liegt, kann die Bewegung der Untereinheiten beim Vorgang der Deoxygenierung als einfache Rotation um gewisse festgelegte Achsen beschrieben werden Die α-Ketten rotieren 9,4° und die β-Ketten 7,4°, verlagern sich jedoch nicht entlang der Achsen (3o).
Die gesamte Bewegung des Zentrums der Masse ist 1,4 Å für α- und 2,9 Å für β-Ketten. Diese Bewegungen rufen Änderungen in den Kontaktregionen hervor.
Der hauptsächliche Unterschied zwischen $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_1\beta_2$ besteht darin, daß durch die Oxygenierung die Rotation zwischen α_1 und β_1 4Å und die Verschiebung zwischen Atomen weniger als 1 Å beträgt. Die Rotation zwischen α_1 und β_2 macht 13,5° aus, und die atomare Verlagerung liegt bei 7 Å (3o). Eine weitere wichtige Charakteristik des $\alpha_1\beta_2$-Kontakts beim Übergang vom T- in den R-Zustand liegt in der Änderung der Wasserstoffbindung (Abb.8).
Die Bewegung der Untereinheiten bei der Oxygenierung wirkt sich auch auf die Entfernung zwischen den Eisen-Atomen aus (s. Tab.1).

Alle Liganden verhalten sich ähnlich in ihrer Reaktion mit Hb trotz der großen Unterschiede, die in den absoluten Werten ihrer Kombinations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten bestehen. Die intramolekulare Konformationsänderung, die bei der Bindung der Liganden hervorgerufen wird, vollzieht sich sehr schnell, verglichen mit der Reaktionsgeschwindigkeit der Liganden. Wie GIBSON (38) nachweisen konnte, besitzen die α- und β-Ketten große Unterschiede bei ihrer Reaktion mit Sauerstoff.

5. DER NORMALE EISENSTOFFWECHSEL (39)

Das Körpereisen setzt sich aus zwei Anteilen zusammen (4o). Der größere macht etwa 75% des Gesamteisens aus und umfaßt

	Deoxyhemoglobin	Oxyhemoglobin
$Fe\beta_1 - Fe\beta_2$	39.9	33.4
$Fe\alpha_1 - Fe\alpha_2$	34.9	36.0
$Fe\beta_1 - Fe\alpha_2$ $Fe\beta_2 - Fe\alpha_1$	24.7	25.0
$Fe\alpha_1 - Fe\beta_1$ $Fe\alpha_2 - Fe\beta_2$	36.9	35.0

Tab. 1 : Entfernungen zwischen den Fe-Atomen in Angström Einheiten im Deoxy und Oxyhämoglobin (nach PERUTZ) (3o).

	Neugeborenes (3,5 kg)		Kind (30 kg)		Erwachsene Frau (50 kg)		Erwachsener Mann (80 kg)	
	g	%	g	%	g	%	g	%
Hämoglobineisen	0,210	77	0,93	74	1,43	69	2,86	69
Funktionelles Gewebseisen	0,028	10	0,12	10	0,32	15	0,51	12
Speichereisen	0,035	13	0,20	16	0,33	16	0,80	19
Gesamteisen	0,273	100	1,25	100	2,08	100	4,17	100
Eisenkonzentration (mg/kg Körpergewicht)	78		42		41		52	

Tab. 2 : Die Eisenverteilung im Organismus in Anhängigkeit von Alter und Geschlecht (39).

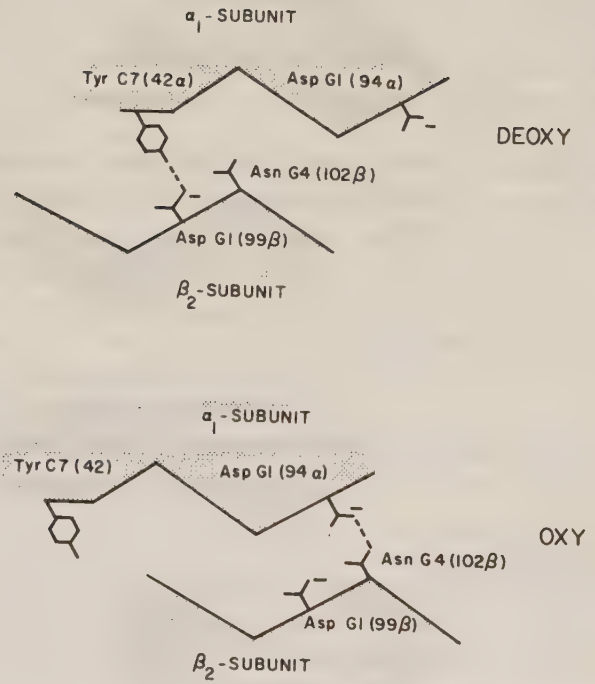


Abb. 8 : Wechsel einer H-Bindung bei dem $\alpha_1\beta_2$-Kontakt bei der Oxygenierung (3o).

Eisenverbindungen wie Hb, Myoglobin, das Eisen in den Enzymen und ihren Kofaktoren sowie die kleine, im Plasma gebundene Menge. Der kleinere Anteil variiert in seiner Größe, macht aber selten mehr als 25% des Gesamteisens aus. Er umfaßt die gespeicherten Eisenverbindungen Ferritin und Hämosiderin, die eine leicht verfügbare Reserve von funktionellem Eisen darstellen.

Die größte Menge Eisen befindet sich im Hämoglobin, weniger im Myoglobin und in geringerem Anteil funktionelles Gewebeeisen, das in den prosthetischen Gruppen des Häms zahlreicher Enzyme eine zentrale Stellung einnimmt. Das Transporteisen bindet sich an das Siderophilin. In dieser Bindung wandert das Eisen vom Ort der Resorption oder aus den Depots an die Stelle des Verbrauchs. Siderophilin ist ein β-Globulin mit einem MG = 9o ooo; pro Molekül bindet es zwei Fe-Atome. Das Speichereisen liegt in zwei Formen vor: Ferritin MG 465 ooo bis 48o ooo, in dem bis etwa 25 Gew% Eisen als Hydroxy- oder Phosphat-Komplexe gebunden wird, und das Hämosiderin, das eine höhere Eisenkonzentration enthält (bis 35 Gew%).

Die Eisenresorption.

Der Vorgang wurde seit vielen Jahren untersucht; trotzdem bleiben bis heute zahlreiche Fragen noch offen. Verschiedene Theorien und Modelle wurden angewandt, um den Mechanismus zu erklären. Aufgrund neuerer Kenntnisse sieht man den Prozeß wie in der folgenden Abbildung (Abb.9) schematisch so:

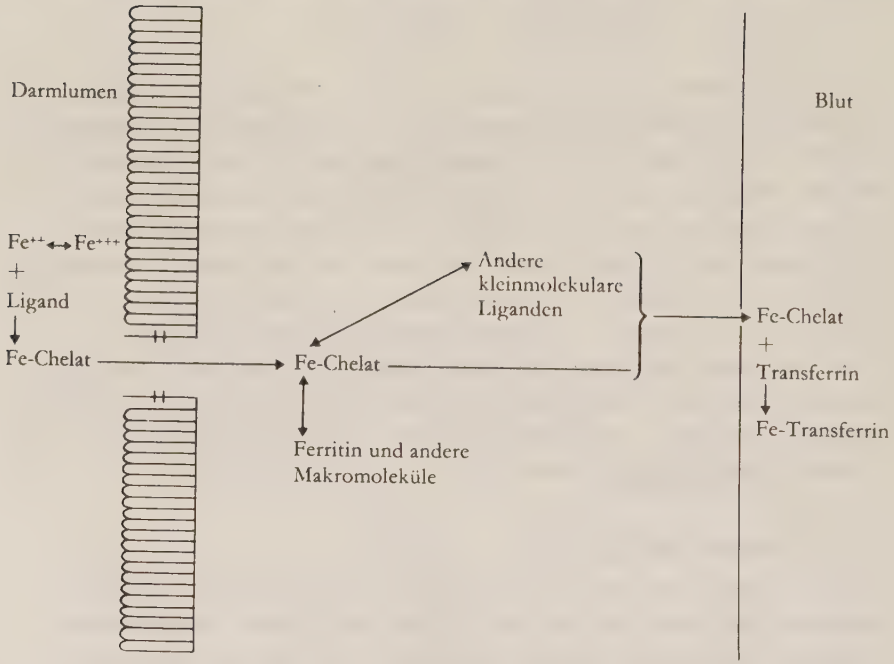


Abb. 9 : Schematische Darstellung der Eisenresorption aufgrund neuerer Erkenntnisse (39).

Wie Experimente zeigten, werden normalerweise 7o-9o% einer an Transferrin gebundenen Eisentracerdosis durch die Erythrozytenvorstufen im Knochenmark für die Hb-Synthese verbraucht, und der gleiche Prozentsatz erscheint innerhalb von 7 bis 14 Tagen in den zirkulierenden roten Blutkörperchen. Der Rest der markierten Dosis wandert in die Eisendepots ab und wird für den Aufbau der Enzyme und Kofaktoren in den übrigen Zellarten verwendet. Aus ferrokinetischen Untersuchungen von POLLYCOVE und MORTIMER (11) geht hervor, daß 21 mg von den insgesamt pro Tag umgesetzten 35 mg Eisen für die Hb-Synthese gebraucht werden, während 11 mg als labile Reserve innerhalb des Knochenmarks verweilen.
Unklar ist der Mechanismus, wie das Eisen vom Transferrin in die Erythrozyten übertritt. Beim Menschen scheint der basophile Erythroblast am meisten Eisen aufzunehmen (42).
Der Retikulozyt ist die letzte Stufe vor der Reife, die noch imstande ist, Transferrineisen aufzunehmen. Der reife Erythrozyt vermag das nicht. Der Übertritt des Fe vom Transferrin in die Zellen scheint an bestimmte Rezeptoren in der Zellmembran gebunden zu sein.
Es ist ferner unbekannt, wie das Eisen von der Zellmembran in das Hämoglobin gelangt (39).

6. AUFBAU DER ATOME UND BEGRIFF DER ISOTOPIE (43).

Wie schon seit Jahrzehnten bekannt, sind die Atome der Elemente aus den sog. Elementarteilchen Protonen, Elektronen und Neutronen ausgebaut. Die ganze Masse des Atoms ist im sog. Atomkern konzentriert, der positiv geladen ist; um ihn kreisen negativ geladene Elektronen in ganz bestimmter schalenähnlicher Anordnung. Diese Elektronenhülle ist für die chemischen Eigenschaften bestimmend. Beim neutralen Atom sind die Kern- und Elektronenladung gleich. Die Kernladungszahl Z eines Elementes gibt seinen Platz in der Periodischen Tabelle an. Der Atomkern ist seinerseits ebenfalls kein einheitliches Gebilde, sondern besteht aus Protonen und Neutronen.

Die Anzahl der erstgenannten in einem Atomkern eines bestimmten Elements wird durch die Kernladungszahl Z festgelegt, während die Anzahl der Neutronen variieren kann. Atome, die sich nur durch die Neutronenzahl im Atomkern unterscheiden, bezeichnet man als Isotope.
Die Trennung verschiedener Isotope desselben Elementes ist schwierig durchzuführen, da sie chemisch praktisch nicht zu unterscheiden sind. Einzig sind die Reaktionsgeschwindigkeiten bei bestimmten chemischen Abläufen und physikalischen Eigenschaften, die Unterschiede aufweisen, bedingt durch ihre verschiedene Masse. Die dadurch beobachteten Phänomene bezeichnet man als Isotopieeffekte. Am bekanntesten sind die Wirkungen von Deuterium (4,5), Tritium (6) und Kohlenstoff (8) auf biologische Systeme, in geringerem Ausmaß wurden auch bei S (37) Isotopieeffekte in Bakterien beobachtet (7).
Das Energieniveau zweier Isotope eines Elementes ist voneinander verschoben. Das einfachste Beispiel bietet sich beim H und D. Diese Verschiebung steht in Verbindung mit der Bewegung des Kerns bezüglich des Massenzentrums des Atoms. Wenn die Masse nach unendlich tendiert, verschwindet diese Energieverschiebung. Bei komplexen Atomen zusätzlich zu diesem Effekt der endlichen Masse gibt es eine Wirkung der endlichen Größe des Kerns (44).
Der Zusatz eines oder zweier Neutronen zu dem Kern führt zu einer Änderung des Kernradius und demzufolge zu einer Verschiebung des Energieniveaus. Die Bindungsenergie von Elektronen in einem Atom ist geringer für ein Isotop von größerer Masse.

7. ZUR THEORIE DER MÖSSBAUER-SPEKTROSKOPIE (entnommen aus 3o,3

Die Mössbauer-Spektroskopie ist eine relativ neue Technik in der Biophysik. Sie wurde von R. MÖSSBAUER entdeckt und ist auch als Kernresonanz Technik bekannt.
Mössbauer-Effekte kann man ohne Schwierigkeiten bei einer Anzahl von Isotopen beobachten.

Der Mössbauer-Effekt gibt Auskunft über die elektromagnetischen Übergänge eines Kerns, der von einem stabilen Grundzustand in einen metastabilen angeregten Zustand übergeht. Die Strahlung besteht aus γ-Strahlen mit Energien in der Größenordnung von 10^4 - 10^5 eV.
Das Auflösungsvermögen rangiert zwischen $1:10^{10}$ und $1:10^{12}$, die meßbaren Unterschiede in den Energieniveaus liegen zwischen 10^{-6} und 10^{-9} eV. Splitterungen dieser Größenordnung sind typisch für die Wechselwirkungen eines Kerns mit den lokalen elektrischen und magnetischen Feldern. Mössbauer-Spektroskopie ermöglicht eine direkte Messung dieser hyperfeinen Zwischenwirkungen, die durch Interaktionen der Elektronen mit dem magnetischen Moment des Kerns hervortreten. Wenn einmal die Kernparameter eines Mössbauer-Isotopen festgestellt sind, kann dieser zur Sondierung innerer Felder in einer Anzahl verschiedener struktureller und chemischer Umgebungen genutzt werden. Die intrinsische Linienbreite der Kernresonanz-Strahlung steht im Verhältnis zu der Lebensdauer (τ) des Kerns in seinem metastabilen Zustand. Für ^{57}Fe ist die Linienbreite = $4{,}5 \times 10^{-9}$ eV.
Die größte beobachtete hyperfeine Splitterung liegt in der Größenordnung von 10^{-6} eV. oder 2oo mal die intrinsische Linienbreite . Die Mössbauer-Strahlungsenergie des Übergangs hat beim ^{57}Fe eine Energie von 14,4 keV. und daher sehr hohes Auflösungsvermögen. Wenn E_α und E_β die Energien eines Nuklids in dem angeregten bzw. Grundzustand sind, ist eine Resonanzabsorption möglich, wenn die im Zerfall emittierte Strahlung $E_\alpha \rightarrow E_\beta$ eines angeregten Kerns der erforderlichen Energie entspricht, um einen Absorberkern von seinem Grundzustand E_β zu seinem metastabilen E_α zu bringen.
Die Energie E_γ eines Gammastrahls ist nicht unbedingt gleich $E_\alpha - E_\beta$, da sie auch vom Bewegungszustand der Quelle des Kerns vor und nach dem Übergang abhängig ist.
Ein freier Kern von Masse M erhält eine Rückstoßenergie

$$R = E_\gamma^2/(2Mc^2),$$

wobei c = Lichtgeschwindigkeit.

Die Gesamtstrahlung hat dann eine geringere Energie: $E_\gamma = E_\alpha - E_\beta - R$, und da die Rückstoßenergie R mehrfach größer als die intrinsische Linienbreite Γ ist, kann eine Resonanz nicht erreicht werden.

Mössbauer entdeckte, daß die rückstoßlose Absorptionsresonanz möglich ist, wenn Quelle und Absorberkerne in einem Festkörper gebunden sind. Unter diesen Bedingungen sind die Kerne auf fixierte Gleichgewichtspositionen begrenzt, und ihre Vibrationsenergie ist quantisiert. Obwohl der durchschnittliche Rückstoßenergieverlust derselbe ist wie für freie Kerne, besteht jetzt eine endliche Wahrscheinlichkeit f; f = rückstoßfreie Übergänge, die nicht eine Änderung im Vibrationszustand des Festkörpers einbeziehen. Für diese rückstoßfreien Übergänge ist die Resonanzbedingung erfüllt. Für metallisches ^{57}Fe ist der rückstoßfreie Anteil f bei Raumtemperatur o,7; bei sehr niedrigen Temperaturen beträgt er o,8.

$$f = e^{-4\pi^2 \langle x^2 \rangle / \lambda^2} \qquad (1)$$

$\langle x^2 \rangle$ = mittlere quadratische Verschiebung des Kerns

λ = Wellenlänge des Gammastrahls $\lambda = hc/E_\gamma$

Mössbauer-Experimente sind nur möglich, wenn der Exponent in (1) die Größe ≥ 1 hat, da sonst die Absorptionsresonanz zu gering ist, um beobachtet zu werden. Die mittlere quadratische Verschiebung hat ihren kleinsten Wert bei 0^o Temperatur; bei dieser Temperatur ändert sie sich nicht viel von einem Festkörper zum anderen.

Mit Temperaturanstieg erhöht sich die quadratische Verschiebung graduell, und beim Herannahen an den Schmelzpunkt des Stoffes wird sie sehr groß. Das bedeutet, daß die Absorptionsresonanz bei niedriger Temperatur gefördert wird und oberhalb des Schmelzpunktes verschwindet.

Bei Untersuchung des Hämoglobins durch die M-Spektroskopie wird eine Probe von hämoglobinenthaltendem roten Blutkörper einem Strahl hochmonochromatischer Gammastrahlen ausgesetzt. Diese stammen von einer radioaktiven Quelle, die ^{57}Fe-Kerne

enthalten, die sich in einem angeregten Zustand befinden und vom Tochterprodukt ^{57}Co herkommen. Wenn das radioaktive ^{57}Co in eine Anzahl Festkörpermatrizen eingebettet ist, wird die Gammastrahllinie so eng, daß ihre Energie leicht mehrere Linienbreiten mittels des Doppler-Effektes verschoben werden kann, das heißt durch Oszillation der Quelle oder Absorber bei mäßigen Geschwindigkeiten.
Der Geschwindigkeitsantrieb, der den Gammastrahlphotonen die Doppler-Verschiebung liefert, ist analog der Streuungsvorrichtung eines Prismas in der optischen Spektroskopie. Bei gewissen Geschwindigkeiten, die den verschobenen Gammastrahlenergien entsprechen, wird die Absorption von γ-Photonen der ^{57}Fe-Kerne, die im Hämoglobin enthalten sind, durch Übergänge vom Kerngrundzustand auf den ersten angeregten Zustand begleitet. Die Kurve der übermittelten Gammastrahl-Intensität als Funktion der Dopplergeschwindigkeit stellt ein Mössbauer-Spektrum dar, in dem charakteristische Absorptionen als Abnahme in der transmittierenden Intensität bei gewissen Geschwindigkeiten darstellt. Durch Übereinkommen wird die Geschwindigkeit positiv bezeichnet, wenn Quelle und Absorber sich in Bewegung zueinander befinden. Der Kern ist sehr empfindlich durch die Tatsache, daß er an andere Kerne gebunden ist und durch die Anwesenheit verschiedener elektrischer und magnetischer hyperfeiner Zwischenwirkungen, die sich durch gewisse kennzeichnende Merkmale der Absorptionsspektren charakterisieren. M-Spektren variieren von einer Eisenverbindung zur anderen und für dieselbe Verbindung unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Häufung, magnetische Felder).
M-Messungen von biologischen Mustern werden normalerweise in gefrorenem Lösungs- oder Pulverzustand durchgeführt.
In beiden Fällen sind die Moleküle wahllos orientiert,und die M-Spektren stellen einen Durchschnittswert aller molekularen Orientierungen dar, was zu einem gewissen Grad an Informationsverlust führt.

Die Interpretation von Mössbauer-Spektren stützt sich auf drei Arten von Wechselwirkungen:

ISOMERVERSCHIEBUNG: (auch chemische Isomerverschiebung genannt).

Sie wird definiert als die Position des Zentrums des Mössbauer-Absorptionsspektrums in Bezug auf die Null-Geschwindigkeit. Der gemessene Wert der Isomerverschiebung hängt von dem Material, in dem die radioaktive Quelle eingebettet ist, ab, gleichwohl die relative Verschiebung zweier Stoffe, deren Spektrum mit derselben Quelle erlangt werden, unabhängig von deren Matrix ist.

Die Isomerverschiebung entsteht durch die elektrostatischen Zwischenwirkungen von S-Elektronen mit einem Kern endlicher Dimension.

Wenn:

E_g = Energie des Kerngrundzustandes

R_g = Radius des sphärischen Kerns

$e|\Psi(0)|^2$ = gesamte elektronische Ladungsdichte innerhalb des Kernvolumens

k = Proportionskonstante

E'_g = wahre Energie des Grundzustandes

ist:

$E'_g = E_g + k R_g^2 e|\Psi(0)|^2$

E'_e = Energie des Kerns im angeregten Zustand

R_e = Radius des angeregten Kerns,

ist die wahre Energie des angeregten Zustandes:

$$E_e = E'_e + k R_e^2 |\Psi(0)|^2$$

Die Energie des ausgesandten Gammastrahls ist:

$$E_\gamma = E_o + ke|\Psi(0)|_S^2 (R_e^2 - R_g^2)$$

wo $E_o = E_e - E_g$ und $|\Psi(0)|_S^2$ sich auf die elektronische Ladungsdichte am Kern beziehen, wenn der letztgenannte im Quellenmaterial eingebettet ist.

Dementsprechend haben wir in der Absorber-Substanz $|\Psi(0)|_A^2$, die sich im allgemeinen von $|\Psi(0)|_S^2$ unterscheidet.

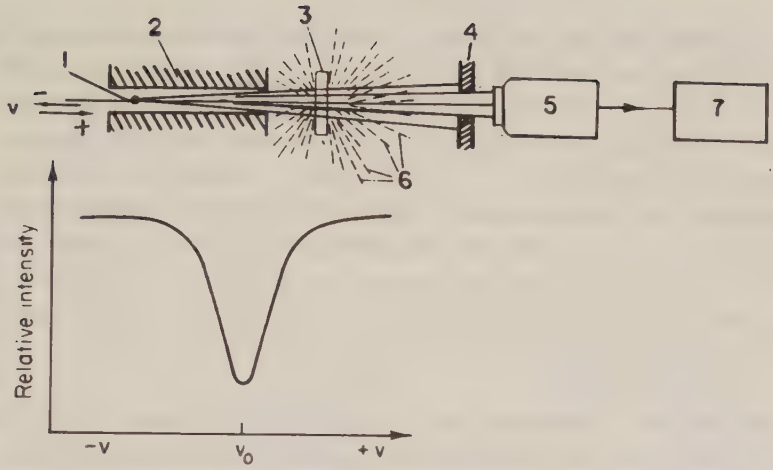


Abb. 1o : Schematische Darstellung eines Mössbauer-Spektroskopie-Gerätes und experimentelle Anordnung zur Beobachtung der Resonanzabsorption von γ-Quanten (46).

(1) Quelle der γ-Quanten, die sich bezüglich eines stationären Absorbers mit der Geschwindigkeit v bewegt.
(2) Kollimator der Quelle
(3) Die zu untersuchende Probe
(4) Kollimator; (5) Strahlungsdetektor
(6) Durch Absorber gestreute γ-Quanten
(7) EDV und Speichervorrichtung

Die Kerneigenschaften sind unabhängig von dem Material, demzufolge wird die Übergangsenergie im Absorber:

$$E'_\gamma = E_o + ke|\Psi(O)^2_A|(R^2_e - R^2_g)$$

Die Differenz zwischen E_γ und E'_γ ist die Isomerverschiebung δ, die in mm/sec ausgedrückt wird. Sie ist ein Maß für den Unterschied in der elektronischen Ladungsdichte um das Kernvolumen der Absorberkerne im Vergleich zu den Kernen der Quelle.

Quadrupol-Splitterung:

Der Atomkern hat keinen statischen elektrischen Dipolmoment, sondern ein elektrisches Quadrupolmoment.

$$Q = (\tfrac{1}{e}) \int (3z^2 - r^2) \rho \, d\tau$$

wobei ρ = Ladungsdichte im Kern
z = z-Achse,

das ein Maß der Exzentrität der ellipsoiden Kernoberfläche ist. Die Quadrupolsplitterung beschreibt die Wechselwirkungen zwischen einem Kernquadrupolmoment und einem elektrischen Feldgradienten.

Magnetische hyperfeine Zwischenwirkungen:

Magnetische hyperfeine Zwischenwirkungen sind die Interaktion zwischen dem Kern und einem magnetischen Feld; dieser kann durch äußere Einwirkung oder als Resultat von verschiedenen elektronischen Konfigurationen entstehen.

Das Gerät: (Abb.1o)

Ein typischer M-Spektrometer besteht schematisch aus:
a) einer Quelle, die Gammastrahlen von genau definierter Energie und Intensität emittiert,
b) die zur Untersuchung bestimmte Probe,
c) Detektor , der die übermittelte Intensität als Funktion der Energie registriert.

Das Energiespektrum wird in passender Weise abgetastet durch Bewegen des Absorbers auf die Quelle hinzu oder von der Quelle weg, so daß eine Verschiebung der Frequenz, d.h. der Energie resultiert.

8. MATERIAL UND METHODE

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden bei 8 Patienten ca. 5 ml venöses Blut entnommen und einem kleinen Röhrchen mit Citrat beigegeben und gemischt, um die Gerinnung zu blockieren.
Innerhalb von 2 h wurden in zwei Eppendorfhütchen je 5o Mikroliter einer Blutprobe pipettiert und 3 Minuten bei 15 ooo xg zentrifugiert. Dem verbleibenden Sediment fügte man 1oo Mikroliter einer Lösung aus 5 ml NaCl o,9% + 1 ml Na-Zitrat hinzu, das nach guter Mischung nochmals 3 Minuten bei 15 ooo xg zentrifugiert wurde. Der verbleibende Rückstand aus intakten Erythrozyten wurde dann auf Filterpapier aufgetragen und getrocknet, je Blutprobe 2 Stück runde, 2 cm Durchmesser große Filterpapiere. Auf diesen Trägern wurde nachträglich die spektroskopische Messung durchgeführt.
Gleich nach der Blutentnahme oder bis höchstens 1 h danach wurde mit einem Teil der Blutprobe ein gesamtes Blutbild mittels Coulter-Counter ZBI zweimal hintereinander gemessen.

9. ERGEBNISSE

Der Vergleich des Mössbauer-Spektrums (s.Abb.11) von 8 Blutproben (Hb von 8 Patienten mit Erythroblastosis, β-Thalassämie und Anämien, s.Tab.3) mit dem Mössbauer-Spektrum von HbO bzw. Hb von Gesunden (Abb.12) ergibt keinen signifikanten qualitativen Unterschied.

10. SCHLUSSFOLGERUNG

Da die Mössbauer-Spektren von Hämoglobinen bei drei untersuchten Krankheitsbildern (Erythroblastosis, β-Thalassämie, Anämien) sich qualitativ nicht von Mössbauer-Spektren vom Hb Gesunder unterscheiden, ist ein veränderter ^{57}Fe-Anteil im Hämoglobin bei diesen Erkrankungen nicht wahrscheinlich.

11. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird ein Überblick über Struktur und Stoffwechsel des Hämoglobins, insbesondere im Hinblick auf seinen Eisengehalt, gegeben und die Frage gestellt, ob bei Krankheiten des Menschen (z.B. Erythroblastosis, β-Thalassämie, Anämien) die natürlich vorkommende Isotopenverteilung von Eisen ^{57}Fe verändert ist.
Diese Frage wurde versucht, mit der Mössbauer-Spektroskopie anzugehen, deren theoretischer Hintergründe hier erklärt werden. Die erhaltenen Mössbauer-Spektren unterscheiden sich qualitativ nicht von solchen Gesunder. Damit dürfte eine ähnliche ^{57}Fe-Konzentration im Hb bei diesen Erkrankten vorliegen wie bei gesunden Personen.

Tab. 3:

ZUSAMMENSETZUNG DER ZELLULÄREN ELEMENTE DES BLUTES VON 8 PATIENTEN

Patient S.N. ♀ 1 Woche alt. Erythroblastosis fetalis.

Probe	
Erythrozyten (10^6 pro Mikroliter)	3,53
Hämoglobin (on g/dl)	11,6
HbE (MCH, ng)	32,8
Hämatokrit (%)	33,1
Leukozyten (10^3 pro Mikroliter)	146

Patient B.S. ♀ 1 Woche alt. Erythroblastosis fetalis.

Probe	
Erythrozyten (10^6 pro Mikroliter)	5,17
Hämoglobin (in g/dl)	18,8
HbE (MCH, ng)	36,2
Hämatokrit (%)	53,6
Leukozyten (10^3 pro Mikroliter)	9 250

Patient G.N. ♂ Neugeborenes 1 Tag alt.

Probe	
Erythrozyten (10^6 pro Mikroliter)	4,74
Hämoglobin (in g/dl)	18,6
HbE (MCH, ng)	39,25
Hämatokrit (%)	52,4
Leukozyten (10^3 pro Mikroliter)	1o 9oo

Patient E.D. ♀ 52 Jahre. Anämie ungeklärter Genese.

Probe	
Erythrozyten (10^6 pro Mikroliter)	4,59
Hämoglobin (in g/dl)	8,1
HbE (MCH, ng)	17,65
Hämatokrit (%)	27,6
Leukozyten (10^3 pro Mikroliter)	43,5

Patient M.N. ♀ Neugeborenes 2 Tage alt. Erythroblastosis fetalis.

Probe	
Erythrozyten (10^6 pro Mikroliter)	3,7o
Hämoglobin (g/dl)	12,9
HbE (MCH, ng)	34,9
Hämatokrit (%)	37,35
Leukozyten (10^3 pro Mikroliter	1o 25o

Patient Sch.N. ♂ 3 Wochen alt. Erythroblastosis fetalis.

Probe	
Erythrozyten (10^6 pro Mikroliter)	3,o2
Hämoglobin (g/dl)	1o,1
HbE (MCH, ng)	33,45
Hämatokrit (%)	28,5
Leukozyten (10^3 pro Mikroliter)	12 4oo

Patient E.R. ♂ 1o Jahre. β-Thalassämie.

Probe	
Erythrozyten (10^6 pro Mikroliter)	1,98
Hämoglobin (g/dl)	4,2
HbE (MCH, ng)	24,1
Hämatokrit (%)	13,9
Leukozyten (10^3 pro Mikroliter)	7 8oo

Patient B.W. ♂ 56 Jahre. Hämochromatose.

Probe	
Erythrozyten (10^6 pro Mikroliter)	3,72
Hämoglobin (g/dl)	13,15
HbE (MCH, ng)	35,9
Hämatokrit (%)	36,6
Leukozyten (10^3 pro Mikroliter)	36,5

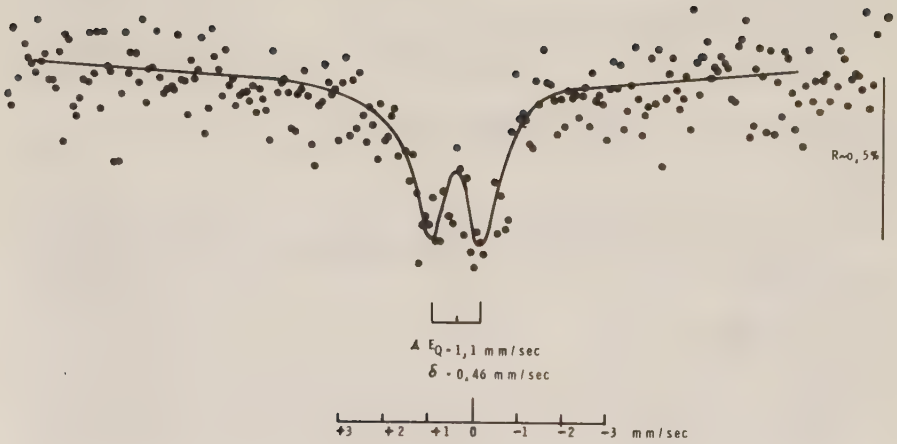


Abb. 11 : Mössbauer-Spektren von getrockneten Erythrozyten von 8 Patienten mit Erythroblastosis, β-Thalassämie und Anämien.

Methodik s.8. Quelle Co^{57} (Pd) 2,5 mCi, $298^{o}K$, Absorber-Temperatur $298^{o}K$.
Ergebnis: δ = + 0,46 mm/sec bezogen auf $Na[Fe(Cn)_5No] \times 2H_2O$. Δ EQ = 1,1 mm/sec.

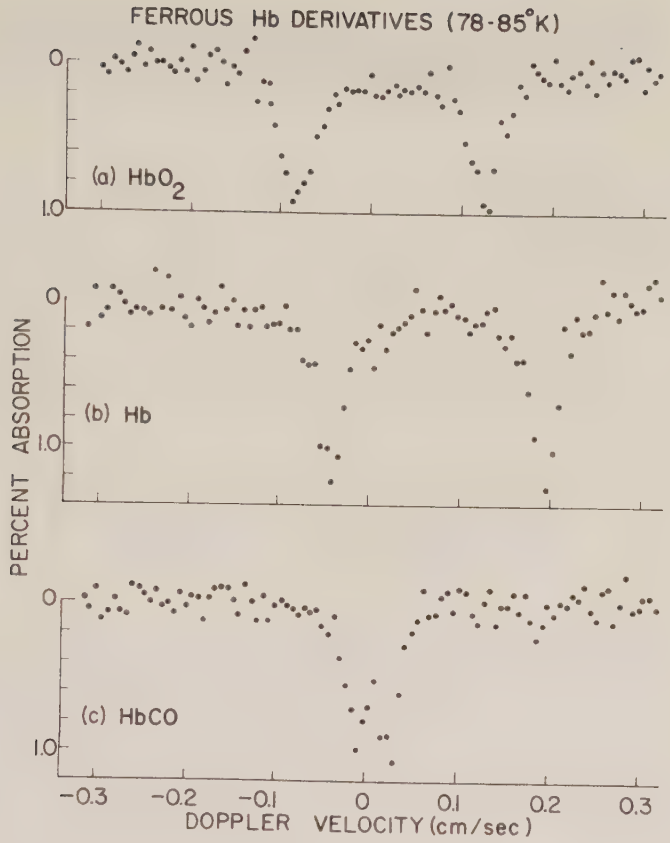


Abb. 12 : Mössbauer-Spektren in
a) Oxyhämoglobin
b) Deoxyhämoglobin
c) Carboxyhämoglobin
aus (3o).

12. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. E. FLUCK, Anorganisch-Chemisches Institut der Universität Stuttgart, habe ich für die Anfertigung der Mössbauer-Spektren sehr zu danken.

LITERATURVERZEICHNIS

1 BOHR, C., HASSELBACH, K., KROGH, A.S.: Über einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluß, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. Skand.Arch.Physiol. 16 (19o4), S. 4o2-412.

2 BENESCH, Ruth, BENESCH, R. and YU, C.I.: The Oxygenation of Hemoglobin in the Presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of Temperature, pH, ionic strength and Hemoglobin Concentration. Biochemistry 8 (1968), S. 2567-2571.

3 AEBI, H.: Kinetic Deuterium Isotope Effects in Enzymic Formate Oxydation. Oure and Appl.Chem. Vol.8 (1964), S. 459-469.

4 GROSS, P.R., SPINDEL, W. and COSINEAU, G.H.: Mitosis and Macromolecule Synthesis in Cells Exposed to D_2O. Pure and Appl.Chem. Vol.8 (1964), S. 483-497.

5 KATZ, J.J., CRESPI, H.L. and FINKEL, A.J.: Isotope Effects in Fully Deuterated Hexoses, Proteins and Nucleic Acids. Pure and Appl.Chem. Vol.8 (1964), S. 471-481.

6 Tritium in the Physical and Biological Sciences, International Atomic Energy Agency, Vienna 1962. Proceedings of a Symposium held in Vienna in 1961.

7 JENSEN, M.L. and NAKAI, N.: Large-Scale Bacteriogenic Fractionation of Sulphur Isotopes. Pure and Appl. Chem. Vol.8 (1964), S. 3o5-315.

8 O'LEARY, M.H.: Enzymic Catalysis of Decarboxylation. Application of Carbon Isotope Effects to Studies of Enzyme Catalyzed Decarboxylation. In: Bioorganic Chemistry 1977.

9 Documenta Geigy - 6th. Edition 1962. Scientific Tables, S. 254.

10 MAHIN D. MAINES and ATTALLAH KAPPAS: Metals as Regulators of Heme Metabolism-Science, Vol. 198, 23 December 1977, S. 1215-1221.

11 GRANICK, S.: J.Biol.Chem. 241 (1966), S. 1359 (zit. in 10).

12 MAHIN D. MAINES and ATTALLAH KAPPAS: J. Exp.Med. 146 (1977), S. 1286 (zit. in 10).

13 MAHIN D. MAINES and ATTALLAH KAPPAS: Biochem.J. 154 (1976), S. 125 (zit. in 10).

14 MAHIN D. MAINES, I. IBRAHIM, A. KAPPAS: Solubilization and Partial Purification of Heme Oxygenase from Rat Liver. J.Biol.Chem. 252 (1977), S. 59oo-59o3.

15 MAHIN D. MAINES and J. COHN: J.Exp.Med. 145 (1977), S. 1o54 (zit. in 10).

16 MAHIN D. MAINES and ATTALLAH KAPPAS: Cobalt Induction of Hepatic Heme Oxygenase with Evidence that Cytochrome P-45o is not essential for this Enzyme Activity. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71 (1974), S. 4293-4297.

17 VALLEE, B.L.: Advances in Protein Chem. 10 (1955), S.317 (zit. in 20).

18 MAZIA, D.: Proc.Natl.Acad.Sci. USA 39 (1953), S.613 (zit. in 20).

19 HYDE, B.B. and PALIWAL, R.L.: Am.J.of Botany 45 (1958), S. 433 (zit. in 20).

20 WACKER, W.E.C. and VALLEE, B.L.: Nucleic Acids and Metals. The Journal of Biol.Chem. Vol.234 (1959), S.3257-3261.

21 BRAUNITZER, G., GEHRING-MÜLLER, R., HILSCHMANN, H. et.al.: Die Konstitution des normalen adulten Hämoglobins. Z.Physiol.Chem. 325 (1961), S. 283.

22 DRESCHER, H., KÜNZER, W.: Der Blutfarbstoff der menschlichen Feten. Klin.Wochenschrift 32 (1954), S. 92.

23 KÜNZER, W.: Human Embryo Hemoglobins. Nature (Lond) 179, S. 477-478.

24 HÜEHNS, E.R., DANCE, N., BEAVEN, G.H. et.al.: Human Embryonic Hemoglobins. Nature (Lond) 2o1, S. 1o95-1o97.

25 COOPER, Herbert A., HOAGLAND, Clark A.: Fetal Hemoglobin. Mayo Clinic Proceedings, Vol. 47 (June 1972), S.4o2-413.

26 SUND, Horst: Große Müleküle. Suhrkamp-VerlaG 197o, S. 45-61.

27 MUIRHEAD, H., COX, J., MAZZARELLA, L. and PERUTZ, M.F.: A Three Dimensional Fourier Synthesis of Human Deoxyhemoglobin at 5,5 A Resolution. J.Mol.Biol. 28 (1967), S. 117-156.

28 MUIRHEAD, H. and GREER, J.: Three Dimensional Fourier Synthesis of Human Deoxyhemoglobin at 3,5 A Resolution. Nature (Lond) 228 (197o), S. 516-519.

29 BOLTON, W. and PERUTZ, M.F.: Three Dimensional Fourier Synthesis of Horse Deoxyhemoglobin at 2,8 A Resolution. Nature (Lond) 228 (197o), S. 551-552.

30 WEISSBLUTH, M.: Hemoglobin: Cooperativity and Electronic Properties. Molecular Biology Biochemistry and Biophysics, Vol.15, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974.

31 NAKAHARA, A., WANG, J.H.: Hemoglobin Studies III: The Effect of Pyridine on the Combination of Heme with Carbon Monoxide. J.Am.Chem.Soc. 80 (1958), S.6526-6527.

32 KENDREW, J.C.: Brookhaven Symposia in Biology 15 (1962), S. 216.

33 KLEBER, Willi: Einführung in die Kristallographie. 10.Aufl. VEB Berlin 1969.

34 DICKERSON, R.E. and GEIS, I.: The Structure and Action of Proteins. New York: Harper & Row 1969.

35 PERUTZ, M.F.: The Croonian Lecture: The Hemoglobin Molecule. Proc.Roy.Soc. B 173 (1969), S. 113-14o.

36 JAVAHERIAN, K., BEYCHOK, S.: J.Mol.Biol. 37, (1968) S.1.

37 INGRAM, D.J.E. and GIBSON, J.F.: Orientation of the Four Haem Groups in Hemoglobin. Nature (Lond) Vol.178 (Oct 27, 1956), S. 9o6-9o8.

38 GIBSON, Quentin H.: The Contribution of the α and β Chains to the Kinetics of Oxygen Binding to and Dissociation from Hemoglobin.

39 MOORE, C.V., BROWN, E.B.: Documenta Geigy: Der Eisenstoffwechsel. Acta Clinica No.7, 1967.

40 MOORE, C.V. and DUBACH, R.: Iron in Mineral Metabolism, Band 2, Teil B: Academic Press New York 1962, S.287. Hrsg.: COMAR, C.L. und BRONNER, F.

41 POLLYCOVE, M. and MORTIMER, R.: The Quantitative Determination of Iron Kinetics and Hemoglobin Synthesis in Human Subjects. J.Clin.Invest. 40 (1961), S. 753.

42 AUSTONI, M.E.: A Cytoautoradiography ^{59}Fe Uptake by Bone Marrow Cells. I. Normal Human Erythroblasts and Young Erythrocytes. Proc.Soc.Exp.Biol. (N.Y.) 92 (1956), S.6.

43 SCHERRER, P. und STEFFEN, R.: Die physikalischen Grundlagen der Isotope. Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften, Vol.5 (1949),

44 SOBELMAN, I.I.: Introduction to the Theory of the Atomic Spectra. Pergamon Press(1972), S. 222-223.

45 Spectroscopic Approaches to Biomolecular Conformation. Edited by D.W. URRY (197o). Am.Med.Ass.Press. Chapter VI: Mössbauer-Spectroscopy of Biomolecules by Peter G. DEBRUNNER, S. 2o9-26o.

46 Chemical Applications of Mössbauer Spectroscopy. Edited by V.I. GOLDANSKI and R.H. HERBER. Academic Press 1968.

47 FEHER, G., ISAACSON, R.A. and SCHOLES, C.P.: ENDOR Studies of Myoglobin and Hemoglobin. Ann.New York Acad. of Sci. (1974), S. 87.

Lebenslauf

Am 22. 2. 1943 wurde ich als ältester Sohn des Rechtsanwaltes Dr. Ernst Pringsheim und seiner Frau Martha Josephine geb. Hatschek in Buenos Aires, Argentinien geboren.
Von 195o bis 1955 besuchte ich die Grundschule, anschließend die Burmeister Schule, eine deutsche Oberschule, die dem Real-Gymnasium entspricht, wo ich im Dezember 196o die Reifeprüfung ablegte.
Im März 1962 begann ich mit dem Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Universität Buenos Aires; die letzte Prüfung legte ich im April 1969 ab.
Am 7. August 1969 wurde mir die Bestallungsurkunde als Arzt ausgehändigt.
Vom Mai 197o bis zum 3o. Juni 1971 war ich als Assistent in der Abteilung für Innere Medizin des Veterans Administration Hospital (Boston, Massachusetts, USA) tätig.
Am 1. August 1971 begann ich mit der neurologischen Fachausbildung am Veterans Administration Hosipital in Long Beach (Kalifornien, USA) und absolvierte das vorgeschriebene Drei-Jahresprogramm.
Bei dem zuständigen Board od Medical Examiners des Staates Kalifornien, die zur Ausübung des ärztlichen Berufes in diesem Staat zuständig sind, legte ich die vorgeschriebene Prüfung ab.
Bereits während eines Deutschlandbesuches 1973 stellte ich, da ich beabsichtigte nach Deutschland zu übersiedeln, einen Approbationsantrag, dem entsprochen wurde. Am 15. März 1974 wurde mir die Approbations-Urkunde zugestellt.
Seit dem 1. September 1974 bin ich an der Universitäts-Nervenklinik Marburg als wissenschaftlicher Assistent tätig.

Meine akademischen Lehrer waren

Altschule, Mark; Alekoumbides, Apostolos; De Robertis, Eduardo; Garcia Velloso, Enrique; Manrique, Eduardo; Mazzei, Egidio; Starr, Arnold; van den Noort, Stanley; Zimmermann, Hyman.